

Qualitative und quantitative Bestimmung der Kohlenhydrate im Urin durch Dünnschichtchromatographie¹⁾

VON W. VON BERG

Aus der Universitäts-Kinderklinik Göttingen (Direktor Prof. Dr. G. Joppich)

(Eingegangen am 27. Juni 1968)

Eine dünnschichtchromatographische Methode zur Trennung und grobquantitativen Bestimmung von klinisch wichtigen Kohlenhydraten im Urin wird angegeben. Die Trennung erfolgt auf Cellulose mit Essigester — Pyridin — Wasser, mit nachfolgender kombinierter Anfärbung durch Anilin-Phthalat/Napthoresorcin-Trichloressigsäure. Die quantitative Auswertung zwischen und nach beiden Färbungen wird durch visuellen Vergleich von Farbintensität und UV-Fluoreszenz der Zucker-Flecken mit gleichzeitig aufgetragenen Testzucker-Gemischen vorgenommen.

Qualitative and quantitative determination of urinary carbohydrates by thin layer chromatography

A thin layer chromatographic method is reported for the separation and roughly quantitative determination of clinically important urinary carbohydrates. The separation is performed on cellulose with ethyl acetate—pyridine—water, and the carbohydrates are located by treatment with aniline—phthalate and then with naphthoresorcinol—trichloroacetic acid. The quantitative evaluation between and after the two treatments is performed visually by comparing the colour intensity and UV-fluorescence of the sugar spots with those from a mixture of test sugars run simultaneously.

Die ersten Untersuchungen über die Trennung von Kohlenhydraten durch die von STAHL eingeführte Dünnschichtchromatographie erschienen 1961 (1, 2, 3). Seitdem sind zahlreiche Arbeiten über dieses Thema veröffentlicht worden (Übersicht bei 4, 5).

Als Träger werden Kieselgel oder Kieselgur angegeben, sowohl ohne Zusätze zur Trennung von Urinzuckern (6) und Zuckerderivaten (7), als auch imprägniert mit Natrium-Bisulfit (8), Natrium-Phosphat (9, 10, 11), Natrium-Acetat (3, 12, 13, 14), Natrium-Borat (15, 16), bzw. Borsäure (1, 2, 13, 17, 18). Auch andere Träger-substanzen, wie Gips (19) oder Polyamid (20) werden empfohlen.

Anorganische Schichten haben den Vorteil, daß aggressive Substanzen wie Schwefelsäure oder andere mineralsaure Sprühreagenzien zur Sichtbarmachung der Zuckerflecke verwendet werden können. Von Nachteil ist jedoch die z. T. recht unbefriedigende Trennung. Besonderes Gewicht muß aus klinischer Sicht darauf gelegt werden, daß Galaktose und Glucose und auch Fructose scharf voneinander unterscheidbar sein müssen, was durch geeignete Fließmittelkombinationen und Pufferung der Sorptionsschicht auch auf Kieselgel oder Kieselgur durchaus möglich ist.

Eine Trennung dieser drei für klinische Fragestellungen wichtigen Kohlenhydrate kann ferner auf einer Celluloseschicht erreicht werden. Kohlenhydrat-Dünnschichtchromatographien mit diesem Träger wurden 1962 von SCHWEIGER (21) angegeben. Seitdem sind auch damit zahlreiche Untersuchungen durchgeführt worden (7, 22—26), sowie mit mikrokristalliner Cellulose (27, 28).

Die Notwendigkeit, schnell und genau einen im Urin ausgeschiedenen Zucker nachweisen und identifizieren zu können, führte uns nach unbefriedigenden Versuchen mit gepufferten und ungepufferten Kieselgel G-Schichten zu der von SCHWEIGER (21) angegebenen

Kohlenhydrat-Dünnschichtchromatographie mit Cellulose als Trägersubstanz. Entscheidend war dabei insbesondere die gute Trennung von Glucose und Galaktose. Als bedeutungslosen Nachteil muß man jedoch in Kauf nehmen, daß aggressive Sprühreagenzien wegen Verfärbungen der Cellulose nicht verwendet werden können.

Methodik

DC-Platten: 15 g Cellulosepulver MN 300 (Macherey, Nagel & Co., Düren) werden mit 90 bis 100 ml dest. Wasser vermischt und 1 Min. mit einem handelsüblichen Mixergerät homogenisiert. Zur Beschichtung von 5 Platten (20 × 20 cm, Schichtdicke 0,25 mm) benutzen wir ein DESAGA-Streichgerät (C. Desaga GmbH, Heidelberg). Nach Lufttrocknung über Nacht werden die Platten 10 Min. bei 105° nachgetrocknet und anschließend im Exsikkator aufbewahrt.

Das **Fließmittelgemisch** besteht aus Essigester / Pyridin / Wasser (40:20:40 v/v), von dem beide Phasen verwendet werden (29). Zu beachten ist, daß sich das Fließmittelgemisch vor dem Einstellen der Platten 10 Min. im Chromatographietrog in seine beiden Phasen trennen muß und nicht wieder aufgeschüttelt werden darf.

Die **Auftrennung** erfolgt eindimensional, 11 cm aufsteigend in zwei aufeinanderfolgenden Läufen mit Zwischentrocknung im zimmerwarmen Luftstrom. Jeder Lauf dauert 60 bis 80 Min.

Zum **Nachweis** der Kohlenhydratflecken werden bei uns zwei sich ergänzende Färbungen, die auf derselben Platte vorgenommen werden, durchgeführt:

Zunächst wird mit Anilin-Phthalat (30) besprüht: 995 mg Phthalsäure werden in 60 ml wassergesättigtem n-Butanol gelöst und danach 0,55 ml Anilin zugesetzt. Zur Farbentwicklung werden die besprühten Platten 10 Min. lang auf 105° (Trockenschrank) erhitzt.

Die auftretenden Farbflecke sowie deren Fluoreszenz im langwelligeren UV-Licht (366 nm) (Mineralight, UVSL-13, San Gabriel, Californien) zeigt Tabelle 1.

Nach Auswertung der Chromatogramme werden die Platten anschließend mit Napthoresorcin-Trichloressigsäure (31) besprüht:

Lösung I: 5 g Trichloressigsäure, gelöst in 25 ml Wasser,

Lösung II: 50 mg Napthoresorcin, gelöst in 25 ml absol. unvergälltem Äthylalkohol. Vor Gebrauch werden beide Lösungen gemischt und das damit besprühte Chromatogramm zur Farbentwicklung ebenfalls 10 Min. auf 105° erhitzt.

¹⁾ Teilweise vorgetragen auf dem VI. Internationalen Kongreß für Klinische Chemie, München, 26.—30. Juli 1966.

Tab. 1
Farbqualität, Fluoreszenz und Nachweisempfindlichkeit von Kohlenhydraten bei Färbung mit Anilin-Phthalat allein

	Tageslicht		UV-Licht (366 nm)	
	Farbe	untere Nachweis-Grenze μg	Fluoreszenz	untere Nachweis-Grenze μg
Lactose	braun	1,0	gelbgrün	0,5
Galaktose	braun	0,3	gelbgrün	0,1
Saccharose	ø	ø	ø	ø
Glucose	braun	0,3	gelbgrün	0,1
Fructose	hellbraun	3,0	schwach gelbgrün	3,0
Arabinose	rotbraun	0,05	rötlich	0,1
Xylose	rotbraun	0,05	rötlich	0,1
Ribose	rotbraun	0,05	rötlich	0,1

Tab. 2
Farbqualität, Fluoreszenz und Nachweisempfindlichkeit von Kohlenhydraten bei kombinierter Färbung mit Anilin-Phthalat und Naphthoresorcin-Trichloressigsäure

	Tageslicht		UV-Licht (366 nm)	
	Farbe	untere Nachweis-Grenze μg	Fluoreszenz	untere Nachweis-Grenze μg
Lactose	braun	1,0	ziegelrot	2,0
Galaktose	schokol. braun	0,3	ziegelrot	0,5
Saccharose	blau	1,0	dunkel auf hellem Grund	1,0
Glucose	schokol. braun	0,3	ziegelrot	0,5
Fructose	rot bis rotbraun	1,0	ø	ø
Arabinose	gelbbraun	0,1	ø	ø
Xylose	gelbbraun	0,1	ø	ø
Ribose	gelbbraun	0,1	ø	ø

Die dann bei den schon bestehenden Flecken beobachteten Farbänderungen sowie die neu auftretenden Flecken sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Auf jeder Platte werden neben den Urinproben gleichzeitig je 1 μl dreier *Testzuckergemische* steigender Konzentration zum Vergleich aufgetragen, wie BICKEL und SOUCHON (32) es analog für die Papierchromatographie von Kohlenhydraten angegeben haben. Das Gemisch besteht aus chromatographisch reiner Lactose, Galaktose, Glucose, Fructose, Xylose und Ribose. Die Konzentrationen in den drei Gemischen betragen je 3, 6 und 9 μg Lactose und Fructose/ μl , bzw. je 1, 2 und 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bei den übrigen Kohlenhydraten. Falls erforderlich werden Arabinose und Saccharose separat aufgetragen.

Vor dem *Auftragen der Urinproben* wird mit der BENEDIKTschen Probe grob-quantitativ der Gehalt an reduzierenden Substanzen im Urin ermittelt. Ist die Probe negativ, werden 10 μl entsalzten Urins aufgetragen. Tritt eine grüne oder gelbe Verfärbung auf, werden nur 1 bis 5 μl Urin verwendet, um eine Überladung des Chromatogramms zu vermeiden. Bei Braunfärbung ist der Urin vor der Entsalzung 1:10 mit Wasser zu verdünnen. Von dieser Verdünnung werden 1 bis 5 μl aufgetragen.

Die *Entsalzung* erfolgt mit einem Mischbett-Ionenaustauscher (Ionenaustauscher V, Fa. Merck AG, Darmstadt). In einem Zentrifugenglas wird etwa 1 ml Urin zu soviel Ionenaustauscher gegeben, daß der Urin 2 bis 3 mm übersteht. Dieses Gemisch muß gut durchgeschüttelt werden und bleibt danach etwa 1 Std., aber nicht länger als 12 Std., stehen. Nach Zentrifugieren kann der klare, farblose Überstand unter mäßig warmem Luftstrom auf die Cellulose-Platte aufgetragen werden.

Die *Auftragungsstellen* der Urinproben und der drei Testzuckergemische sind 3 cm vom unteren Rand und untereinander 1,5 cm entfernt, so daß auf einer Platte bis zu 10 Urinproben gleichzeitig untersucht werden können.

Ergebnisse

Die R_F -Werte nehmen in der Reihenfolge Disaccharid-Hexose-Pentose zu (Tab. 3).

Dabei lassen sich die Kohlenhydrat-Paare Saccharose/Galaktose und Fructose/Arabinose nicht trennen. Sie können aber wegen ihrer verschiedenen Farbqualität

Tab. 3
 R_F -Werte der Kohlenhydrate auf Cellulose MN 300 im System Essigester/Pyridin/Wasser (40:20:40 v/v)

	R_F
Lactose	0,33
Galaktose	0,44
Saccharose	0,45
Glucose	0,48
Fructose	0,53
Arabinose	0,53
Xylose	0,60
Ribose	0,66

mit Anilin-Phthalat, aufgrund ihrer unterschiedlichen UV-Fluoreszenz und schließlich durch Nachfärbung mit dem Ketose-Reagenz Naphthoresorcin-Trichloressigsäure unterschieden werden (vgl. Tab. 1, 2 und Abb. 1).

Die unteren Nachweisgrenzen sind in den Tabellen 1 und 2 aufgeführt. Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, daß die Nachweisempfindlichkeit der Aldohexosen Galaktose und Glucose unter UV-Licht gegenüber Betrachtung bei Tageslicht um das Dreifache und von Lactose um das Doppelte gesteigert wird. Die kombinierte Färbung mit Anilin-Phthalat/Naphthoresorcin-Trichloressigsäure

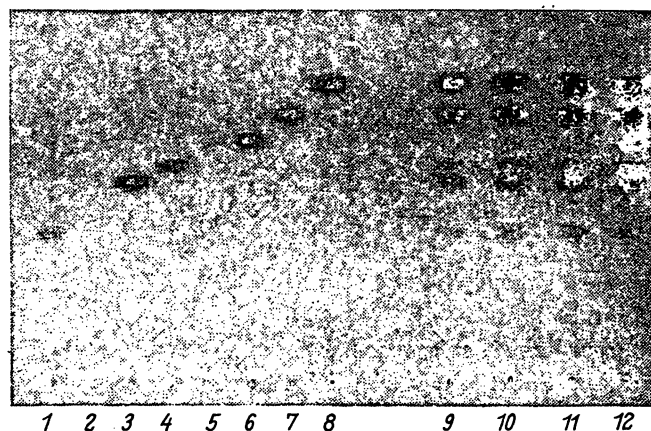
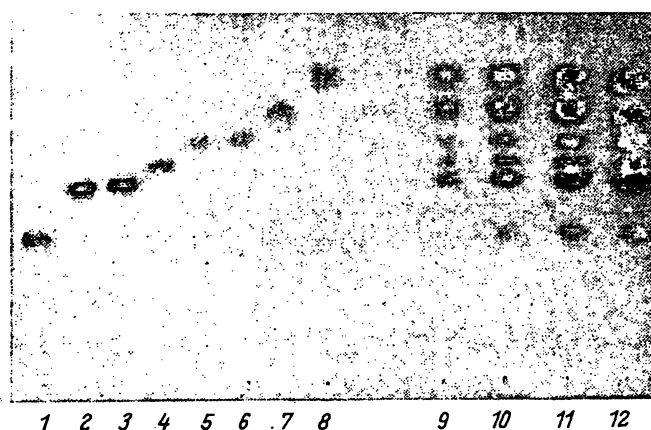


Abb. 1
Dünnschichtchromatogramme von Kohlenhydraten auf Cellulose. 2malige Chromatographie mit Essigester/Pyridin/Wasser (40:20:40 v/v)

a) Anfärbung mit Anilin-Phthalat



b) Mit Naphthoresorcin-Trichloressigsäure nachgefärbt

1 = Lactose (9 μg), 2 = Saccharose (10 μg), 3 = Galaktose (3 μg), 4 = Glucose (3 μg), 5 = Fructose (6 μg), 6 = Arabinose (1 μg), 7 = Xylose (1 μg), 8 = Ribose (1 μg), 9 = Testgemisch von 3, 4, 7, 8 (je 1 μg), 1 und 5 (je 3 μg), 10 = wie 9, jedoch je 2 μg bzw. 6 μg , 11 = wie 9, jedoch je 3 μg bzw. 9 μg , 12 = wie 11, dazu Arabinose (1 μg) und Saccharose (10 μg)

Die Auftragsmengen liegen zur besseren Wiedergabe weit über den unteren Nachweisgrenzen

hat den Vorteil, daß Fructose gut dreimal empfindlicher reagiert als mit Anilin-Phthalat allein. Außerdem wird dadurch die mit Anilin-Phthalat nicht anfärbbare Saccharose deutlich blau sichtbar (Tab. 2 und Abb. 1).

Durch die gleichzeitig mit den Urinproben mitlaufenden Testzuckergemische verschiedener Konzentration sind auch quantitative Angaben über die im Urin ausgeschiedenen Kohlenhydrate möglich. Dazu wird die Farbintensität bzw. die UV-Fluoreszenz der Testzucker mit dem entsprechenden Fleck der Urinprobe visuell verglichen. Für klinische Belange ist diese Methode hinreichend genau, um grobe Abweichungen von der Norm zu erkennen.

Diskussion

Die angegebene Methode der Kohlenhydrat-Dünnschichtchromatographie am Urin hat sich bei uns in dreijähriger Routine bewährt. Sie ist besonders gut dazu geeignet, bei ungeklärten Mellituriën oder bei Verdacht auf eine angeborene Kohlenhydrat-Stoffwechselstörung die Art des ausgeschiedenen Zuckers schnell und einfach zu klären und darüber hinaus auch hinreichend genau quantitative Aussagen zu machen. Die Dringlichkeit einer schnellen Diagnosestellung wird besonders bei solchen angeborenen Erkrankungen des Kohlenhydrat-Stoffwechsels deutlich, bei denen eine frühzeitig einsetzende Behandlung oft von lebenswichtiger Bedeutung ist.

Literatur

1. PASTUSKA, G., Z. analyt. Chem. 179, 427 (1961).
2. PREY, V., H. BERBALK und M. KAUSZ, Mikrochem. Verein. Mikrochim. Acta (1961) 968.
3. STAHL, E. und K. KALTENBACH, J. Chromatogr. 5, 351 (1961).
4. STAHL, E., Dünnschicht-Chromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch. 2. Aufl. Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1967).
5. RADERATH, K., Dünnschicht-Chromatographie. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. (1965).
6. BECKER, S. und P. MAY, Amer. J. Clin. Path. 49, 436 (1968).
7. BANCHER, E., H. SCHERZ und K. KAINDL, Mikrochem. Verein. Mikrochim. Acta (1964) 1043.
8. ADACHI, S., J. Chromatogr. 17, 295 (1965).
9. LOMBARD, A., J. Chromatogr. 26, 283 (1967).
10. OVODOV, Y. S., E. V. EVTUSHENKO, V. E. VASKOVSKY, R. G. OVODOVA und T. F. SOLOV' EVA, J. Chromatogr. 26, 111 (1967).
11. WALDI, D., J. Chromatogr. 18, 417 (1965).
12. BANCHER, E., H. SCHERZ und K. KAINDL, Mikrochem. Verein. Mikrochim. Acta (1964), 652.
13. PIFFERI, P. G., Analytic. Chem. 37, 925 (1965).
14. STEFANIS, DE, V. A. und J. G. PONTE jr., J. Chromatogr. 34, 116 (1968).
15. KÄSER, H. und G. MASERA, Schweiz. med. Wschr. 94, 158 (1964).
16. MARTINS, P. M. und Y. P. DICK, J. Chromatogr. 32, 188 (1968).
17. BARON, D. N. und J. ECONOMIDIS, J. Clin. Path. London 16, 484 (1963).
18. LATO, M., B. BRUNELLI, G. CIUFFINI und T. MEZZETTI, J. Chromatogr. 34, 26 (1968).
19. AFFONSO, A., J. Chromatogr. 27, 324 (1967).
20. MARAIS, J. P., J. Chromatogr. 27, 321 (1967).
21. SCHWEIGER, A., J. Chromatogr. 9, 374 (1962).
22. GRAU, R. und A. SCHWEIGER, Zschr. Lebensmittelunters. 119, 210 (1963).
23. GÜNTHER, H. und A. SCHWEIGER, J. Chromatogr. 17, 602 (1965).
24. VOMHOF, D. W., J. TRUITT und T. C. TUCKER, J. Chromatogr. 21, 335 (1966).
25. VOMHOF, D. W. und T. C. TUCKER, J. Chromatogr. 17, 300 (1965).
26. LAMKIN, W. M., D. N. WARD und E. F. WALBORG, Analyt. Biochem. 17, 485 (1966).
27. WOLFROM, M. L., D. L. PATIN und R. M. DE LEDERKREMER, J. Chromatogr. 17, 488 (1965).
28. WOLFROM, M. L., R. M. DE LEDERKREMER und G. SCHWAB, J. Chromatogr. 22, 474 (1966).
29. ISHERWOOD, F. A. und M. A. JERMYN, Biochem. J. 48, 515 (1951).
30. PARTRIDGE, S. M., Nature (London) 164, 443 (1949).
31. PARTRIDGE, S. M., Biochem. J. 42, 238 (1948).
32. BICKEL, H. und F. SOUCHON, Arch. Kinderhk. Stuttgart 31. Beiheft (1955).

Dr. W. von Berg
34 Göttingen, Universitäts-Kinderklinik
Humboldtallee 38.